

Lungenkrebs unter Stress

Lung Cancer under Stress

PD Dr. med. Sabina Berezowska
Institut für Pathologie
Universität Bern
Murtenstrasse 31
CH-3008 Bern
Tel.: +41 31 632 4937
Fax: +41 31 632 9938
E-mail: sabina.berezowska@pathology.unibe.ch

Zusammenfassung

Hintergrund. Autophagie ist für die zelluläre Homöostase verantwortlich und sichert unter Stressbedingungen das zelluläre Überleben. Autophagiemodulation kann therapeutisch genutzt werden. Das *in-vitro* Monitoring des Autophagieflusses ist gut etabliert.

Die Analyse im Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe ist bisher unzureichend standardisiert. Expressionsanalysen der Autophagie-assoziierten Proteine in diagnostischem FFPE Gewebe können bei der Translation von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung in die Klinik helfen, und eine Rolle bei einer zukünftigen Suche nach prädiktiven Biomarkern spielen.

Material und Methoden. Wir haben eine verlässliche immunhistochemische Färbung Autophagie-assoziiierter Proteine in FFPE Gewebe mittels Zelllinien mit einerseits funktionell modifiziertem Autophagiestatus und andererseits depletierten Proteinen etabliert, und deren prognostischen Wert in Lungenkarzinomen untersucht.

Ergebnisse. Punkt-förmige immunhistochemische Färbungen für LC3 und p62 stellten Autophagosomen dar, und korrelierten signifikant mit den etablierten Proteinexpressionsmustern der Western Blot Untersuchung. Weder in Stadium I/II Lungenkarzinomen, noch in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen zeigte sich eine eindeutige prognostische Signifikanz einer LC3-p62 Kombination. Eine isolierte p62-Expression war in beiden Kohorten ein unabhängiger prognostischer Marker für kürzeres Überleben.

Schlussfolgerungen. Die valide Visualisierung Autophagie-assoziiierter Proteine ist in FFPE Gewebe möglich. In Lungenkarzinomen konnten wir keinen klaren prognostischen Wert des Autophagiestatus demonstrieren, wie er aus der LC3-p62 Co-Expression abgeleitet werden kann. Die möglicherweise Autophagie-unabhängige Rolle von p62 muss weiter untersucht werden.

Schlüsselwörter: Lungenkrebs – Immunhistochemie – Autophagie – LC3 – p62

Abstract

Background. Autophagy is a cellular mechanism involved in maintaining cellular homeostasis and warranting cellular survival under stress, and may be therapeutically exploited. Autophagy assessment *in vitro* is well established, but analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue is still poorly standardized. Expression analysis of autophagy associated markers in diagnostic FFPE tissue aids in translating *in vitro* findings to the clinics and may contribute to a future quest for predictive markers.

Materials and methods. We have established a reliable visualization of autophagy related proteins in FFPE tissue by immunohistochemistry, using lung cancer cell lines with functionally modified autophagy states and marker-depletion, respectively, and evaluated the prognostic impact of autophagy related markers in lung cancer patients.

Results. Dot-like staining was observed for LC3 and p62, representing the degrading autophagic vesicles. Stainings correlated significantly with quantitative protein expression assessed by Western blot in cell lines and FFPE tumor tissue. In stage I/II non-small cell lung cancer cases and a large cohort of pulmonary squamous cell carcinomas, dot-like LC3 and p62 staining lacked clear prognostic value, but p62 expression was an independent prognostic factor for shorter survival in both cohorts and using internal validation models.

Conclusions. In summary, valid visualization of autophagy related markers in FFPE tissue is feasible. We could not demonstrate a clear prognostic role of autophagy-status as deduced from LC3-p62 co-expression. The autophagy independent role of p62 in lung cancer warrants further investigation, as well as crosstalk with other stress factors or the role of autophagy induction during or after treatment.

Keywords: Lung cancer – immunohistochemistry – autophagy – LC3 – p62

Einleitung

Als Pathologen integrieren wir im diagnostischen Alltag Morphologie, Proteinexpression und genetische Daten zu einer integrativen Diagnose. Durch die Visualisierung von Gewebecharakteristika können wir auch einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung in die Klinik zu transferieren.

Zellulärer Stress, durch extrinsische oder intrinsische Faktoren verursacht, spielt eine große Rolle bei verschiedensten Erkrankungen, darunter auch Krebs. Krebszellen wiederum werden durch Therapie ebenfalls unter Stress gesetzt. Für ein besseres Verständnis dieser Stressreaktionen, speziell im Hinblick auf das Ansprechen oder die Resistenz auf Krebstherapien wäre es interessant, diesen Stress bzw. seine Auswirkungen in Tumorzellen visualisieren zu können.

Im Folgenden soll auf die Möglichkeiten der Visualisierung von Stress in Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe am Beispiel des Lungenkarzinoms anhand des Mechanismus der Autophagie eingegangen werden.

Was ist Autophagie?

Autophagie ist ein evolutionär konservierter zellulärer Überlebensmechanismus, der als basale Autophagie für die zelluläre Homöostase verantwortlich ist, und bei zellulärem Stress, z.B. in Form von Nährstoffdefizienz, durch die Gewährleistung einer alternativen Energieversorgung das zelluläre Überleben sichert [18, 19].

Der Mechanismus der Makroautophagie (im Folgenden vereinfacht „Autophagie“ genannt) ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt [14]. Er besteht aus der Ausbildung eines Doppelmembranvesikels (Autophagosom), in welchen die zu degradierenden Substrate eingeschlossen werden, entweder in einem unselektiven Prozess, oder ubiquitiniert in einem selektiven Prozess unter Zuhilfenahme spezifischer Rezeptoren. Dabei handelt es sich um dysfunktionale Organellen und fehlgefaltete oder langlebige Proteine. Durch die Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom wird der Inhalt des Autolysosoms enzymatisch degradiert, und dient dann dem Aufbau neuer Proteine. Somit handelt es sich um eine Art intrazelluläres Recycling. Die Hauptcharakteristika des Autophagiemechanismus, also Initiation, Elongation, Autophagosomschluss, Maturation und Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom, werden durch eine Reihe Autophagie (ATG)-assoziierter Gene reguliert, für deren initiale Beschreibung in Hefepilzen der japanische Forscher Yoshinori Ohsumi 2016 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt worden ist.

Die Rolle der Autophagie in Malignomen

Defekte im Mechanismus der Autophagie werden mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht [7, 12]. Die Rolle der Autophagie in Malignomen ist wahrscheinlich stark von dem Stadium der Erkrankung abhängig, weshalb sie auch als sog. „zweischneidiges Schwert“ angesehen wird [3, 17, 27]. Bei der Tumorentstehung wirkt

Autophagie durch die Erhaltung der Homöostase in erster Linie tumorsupprimierend. Es ist davon auszugehen, dass nach Etablierung des malignen Phänotyps intakte Autophagie als zellprotektiver Mechanismus den durch Nährstoffknappheit oder Therapie gestressten Tumorzellen zu überleben hilft.

Autophagie könnte daher eine Rolle beim Therapieansprechen und bei der Resistenzentwicklung spielen. Zu welchem Zeitpunkt ein Eingreifen in den Autophagie-Mechanismus den größten Effekt bewirkt muss jedoch noch etabliert werden. Nichtsdestotrotz werden Autophagie-Modulatoren bereits in frühen Phasen klinischer Studien in unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Hier wäre v.a. das als Malariamittel klinisch gut bekannte (Hydroxy-)Chloroquin zu nennen, aber auch spezifischere Agentien befinden sich bereits in der Entwicklung. Die Art der Autophagie-modulierenden Antitumorthérapie wird sicher von Tumortyp und Tumorstadium abhängen. Zum Beispiel würde die Differenzierungstherapie in akuter myeloischer Leukämie von einer Aktivitätssteigerung der Autophagie profitieren, wohingegen die Aktivität von Tyrosinkinase-Inhibitoren durch Kombination mit Autophagieinhibitoren gesteigert werden kann. Für umfassende Zusammenfassungen laufender klinischer Studien wird auf aktuelle Übersichtsarbeiten verwiesen [4, 22].

Eine Visualisierung der Autophagie in FFPE-Gewebe kann in der translationalen Forschung in der Entwicklung Autophagie-modulierender klinischer Ansätze eine Rolle spielen, und zukünftig als möglicher Gewebe-assoziiertes prädiktives Biomarker von Nutzen sein.

Visualisierung von Autophagie *in-vitro*

Das *in-vitro* Monitoring des Autophagieflusses ist gut etabliert [9]. Das Mikrotubulus-assoziierte Protein 1 Leichtkette 3 (LC3) liegt frei im Zytoplasma vor, und wird in der lipidisierten Form in das Autophagosom eingebaut, dessen wichtigen Bestandteil es darstellt. Aus der Ratio zwischen lipidisiertem LC3 (LC3-II) und nicht-lipidisiertem LC3 (LC3-I) im Western Blot kann auf die Anzahl der Autophagosomen rückgeschlossen werden. Da eine Zunahme an LC3-II sowohl aus der Aktivitätssteigerung der Autophagie als auch durch einen Block der Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom mit nachfolgender Akkumulation der Autophagosomen resultieren kann, müssen zwingend Kontrollexperimente durchgeführt werden. Nach kontrollierter Aktivitätssteigerung der Autophagie durch z.B. Nährstoffentzug kommt es zu einer erwarteten Zunahme von LC3-II. In einem Kontrollexperiment wird zudem die Fusion von Autophagosom und Lysosom experimentell durch Zugabe von Bafilomycin A inhibiert. Dadurch kommt es bei gesteigerter Autophagie zu

einer weiteren Zunahme an LC3-II. Falls die LC3-II Zunahme initial auf einem Block der Autophagie im späten Stadium beruhte (also auf einem Defekt im Autophagiemechanismus), kommt es zu keiner weiteren LC3-II Steigerung mehr. Sequestosom 1 (SQSTM1)/p62, im Folgenden kurz p62 genannt, ist ein weiteres wichtiges Protein, welches LC3 mit den zellulären Komponenten verbindet, die degradiert werden sollen. Autophagosomen können auch als Punkte mittels LC3-Immunfluoreszenz visualisiert werden. Aber auch weitere Proteine können untersucht werden, die eine Rolle im Autophagiemechanismus also v.a. bei der Ausbildung des Autophagosoms eine Rolle spielen (z.B. Beclin 1, ULK1, ATG5, etc.). Ebenfalls sind weitere *in-vitro* Assays etabliert, um zusätzlichen Einblick in den Funktionszustand der Autophagie zu erhalten. Für eine Auflistung und Beschreibung aller empfohlenen Assays zur Untersuchung der Autophagie wird auf die eine regelmäßig aktualisierte Leitlinienpublikation der internationalen Expertengruppe für Autophagie verwiesen [9].

Visualisierung von Autophagie in FFPE Gewebe

Die Methode der Wahl für die Untersuchung von Autophagie in großen Kollektiven am FFPE Gewebe ist die immunhistochemische Visualisierung der Autophagosomen, die – wie oben beschrieben – ein Kennzeichen der Autophagie darstellen [10, 13, 15, 16]. Im Gegensatz zu Methoden, denen eine Homogenisierung des Gewebes vorangeht (z.B. Western Blot), ermöglicht die Immunhistochemie die Visualisierung der Proteine innerhalb der spezifischen zellulären Kompartimente, was insbesondere für die Untersuchung von Aktivitätsunterschieden in ubiquitär vorhandenen Mechanismen wie der Autophagie sehr wichtig ist. Umso wichtiger ist daher jedoch auch die Gewährleistung der Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Färbung.

Wir haben für die Etablierung daher FFPE-Pellets etablierter Zelllinien mit kontrolliert gesteigerter Autophagie (durch Nährstoffentzug) und weiterer Steigerung der Autophagosomenanzahl durch Bafilomycin A-Zugabe generiert. Als Kontrollen der Spezifität wurden FFPE-Pellets gleichartig behandelter Zellen nach vorheriger genetischer Herunterregulierung von LC3 oder p62 generiert. Die Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Färbung wurde im parallel durchgeführten Western Blot bestätigt (Abbildung 2) [25]. Die Färbeprotokolle wurden in einem Leica Bond Färbeautomaten entwickelt [2].

Die immunhistochemischen Färbungen für LC3 und p62 wurden an einem großen Kollektiv von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen auf die prognostische Signifikanz hin untersucht, und dabei das Ergebnis der immunhistochemischen LC3 und p62-Expression an einem

kleinen Subkollektiv durch parallel durchgeführte Western Blot Analysen aus FFPE Gewebe validiert [24].

Wie sich aus der Beschreibung der oben aufgeführten Bewertung der LC3-Muster im Western Blot ergibt, lässt der alleinige Nachweis der Autophagosomen in einer Momentaufnahme, die die Untersuchung des FFPE-Tumorgewebes darstellt, keine Rückschlüsse darauf zu, ob die z.B. festgestellte Vermehrung der Autophagosomen aus einer Aktivitätssteigerung der Autophagie oder einer defekten Autophagie im späten Stadium resultiert. Daher schlagen Liu und Kollegen vor, die Kombination aus punktförmiger LC3 und p62 Expression als Surrogatmarker für die Autophagie-Aktivität einzusetzen [13]: Tiefe Level an punktförmigem LC3 und punktförmigem und zytoplasmatischem p62 ($LC3B^{tief}/p62^{tief}$) sprechen für basale Autophagie. $LC3B^{tief}/p62^{hoch}$ spricht für eine beeinträchtigte basale Autophagie, d.h. einen im frühen Stadium beeinträchtigten Autophagiemechanismus mit wenigen Autophagosomen und einer Akkumulation von p62, oder für eine Autophagie-unabhängige p62-Induktion. Hohe Level an punktförmigem LC3 und tiefe Level an punktförmigem und zytoplasmatischem p62 ($LC3B^{hoch}/p62^{tief}$) weisen auf eine aktivierte, intakte Autophagie hin. Hohe Level von punktförmigem LC3 und p62 ($LC3B^{hoch}/p62^{hoch}$) sprechen für eine aktivierte Autophagie, die in späten Stadien beeinträchtigt ist, mit Akkumulation von sowohl Autophagosomen als auch p62 [13].

In unserem Kollektiv nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome, die in frühen Stadien reseziert worden sind (UICC Stadium I und II nach TNM 7. Auflage, 2009) haben wir keine eindeutige Assoziation zwischen der kombinierten Expression der Autophagie-assoziierten Marker LC3 und p62 und Prognose nachweisen können. Patienten, deren Tumoren eine hohe Anzahl an Autophagosomen aufzeigten ($LC3^{hoch}$), hatten zwar den Trend zur einer besseren Prognose, das Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant [24]. In einer nachfolgend untersuchten, klinisch-pathologisch sehr aufwändig annotierten Lungenkarzinom-Kohorte konsekutiver primär resezierter Plattenepithelkarzinome aller Stadien zeigte sich in einer retrospektiven Untersuchung eine bessere Prognose für Patienten, die eine aktivierte, intakte Autophagie entsprechend der Surrogatmarkerexpression $LC3^{hoch}/p62^{tief}$ zeigten [11].

Aus der multivariaten Analyse ist jedoch in beiden aufgeführten Lungenkarzinom-Kohorten lediglich die kombinierte zytoplasmatische und punkt-förmige p62-Expression als unabhängiger prognostischer Marker hervorgegangen. Die p62-Positivität in den Tumorzellen, unabhängig vom LC3-Status, war mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten assoziiert [11, 24].

Diese Assoziation wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in Lungenkarzinomen berichtet [5, 26] und von uns und anderen in weiteren soliden Tumoren beobachtet [1, 23]. P62 ist ein sehr versatiles Molekül, und spielt in multiplen anderen Signalwegen eine wichtige Rolle,

z.B. beim Kelch-like ECH-associated protein 1 (KAEP1)/NF-E2-related factor 2 (NRF2) Stress-Signalweg, dem NF-kappa B Signalweg oder der Stress-Antwort des endoplasmatischen Retikulums, die Autophagie-abhängig und Autophagie-unabhängig sein können [6, 8, 20, 21].

Der prognostische Wert der p62 Expression könnte somit Autophagie-unabhängig sein. Dies sollte jedoch nicht dazu verleiten anzunehmen, dass die Autophagie und eine therapeutische Manipulation derselben in Lungenkarzinomen keine Rolle spielen. P62 hat sich in unabhängigen Studien an Lungenkarzinomen als wichtiges prognostisches Protein herauskristallisiert, ist ein wichtiges Protein im Autophagiemechanismus, und wird mittels Autophagie degradiert. Zusätzliche mechanistische Studien müssen aufzeigen, wie dies therapeutisch genutzt werden kann.

Unsere Resultate zur Expression der Autophagiemarker sind auf die Zukunft hin ausgerichtet. Sobald die therapeutische Autophagiemodulation den Weg aus klinischen Studien hinein in den klinischen Alltag nimmt, ist davon auszugehen, dass eine tumorale LC3 und p62 Expression als prädiktive Biomarker evaluiert werden. Unsere retrospektiven Daten weisen darauf hin, dass LC3 alleine oder in Kombination mit p62 *per se* keinen Marker für eine bessere Prognose darstellt. Zusätzlich legen unsere Ergebnisse eine Fokussierung künftiger Studien auf p62 nahe, ein Protein, das eine wichtige Rolle in Lungenkarzinomen zu spielen scheint, und über eine Aktivitätssteigerung der Autophagie degradiert werden könnte.

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Prof. Dr. rer. nat. Mario Tschan und seine gesamte Autophagie-Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie der Universität Bern, darunter insbesondere an Dr. rer.nat. Anna Bill(-Schläfli), für die hervorragende und stimulierende Zusammenarbeit. Ich danke meinen bei der Zusammenstellung der beschriebenen Kollektive aktiv beteiligten Medizindoktoranden Manuel Keller und Yasin Irmak, der Translational Research Unit des Instituts für Pathologie der Universität Bern für die hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung der zitierten Projekte, sowie Herrn Prof. Dr. med. Rupert Langer für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Interessenkonflikt

S. Berezowska gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

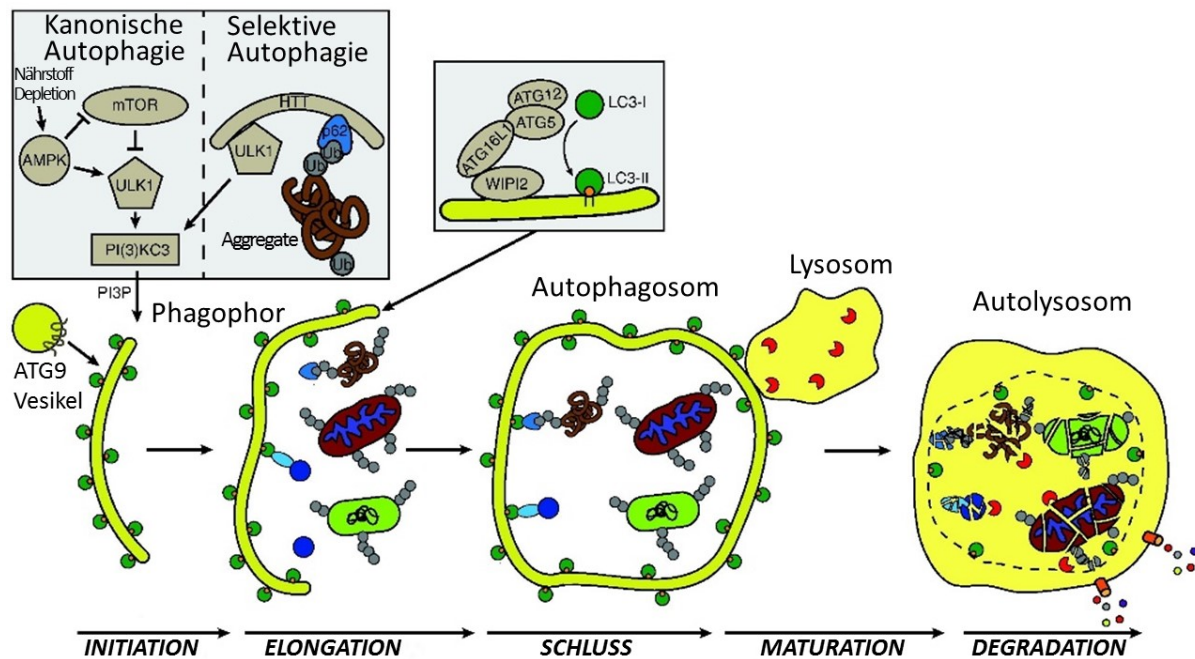


Abb. 1 Mechanismus und Regulation der Autophagie. Die Stadien der Autophagie (Initiation, Elongation, Schluss, Maturation und Degradation) werden gezeigt. Cargo wird in unselektiver und selektiver Degradation in einem Doppelmembran-Phagophor sequestriert, welches zu einem Autophagosom fusioniert. Dieses fusioniert wiederum mit einem Lysosom zu einem Autolysosom, in dem der Inhalt durch lysosomale Enzyme degradiert wird. Die Degradationsprodukte werden dann durch lysosomale Transporter in das Zytosol recycled. mTOR ist ein Schlüsselregulator der unselektiven Autophagie aufgrund von Änderungen der Nährstoffverfügbarkeit. WIPI2 bindet ATG16L1, um den Komplex aus ATG5-ATG12-ATG16L1 an der Autophagosomen-Membran zu binden. Dieser Komplex konjugiert Phosphatidylethanolamin an LC3-I, um lipidisiertes LC3-II zu generieren, welches dann eine Rolle in der Membranelongation spielt. LC3-II wird in der äusseren und inneren Membran des Autophagosoms eingebaut (in der Abbildung als grüne Kreise mit orangem PE-Bestandteil dargestellt), und fungiert als physikalisches Bindeglied zwischen den Rezeptoren der selektiven Autophagie (z.B. p62, in der Abbildung blau) und der Membran des Autophagosoms.

(Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier adaptiert aus [14])

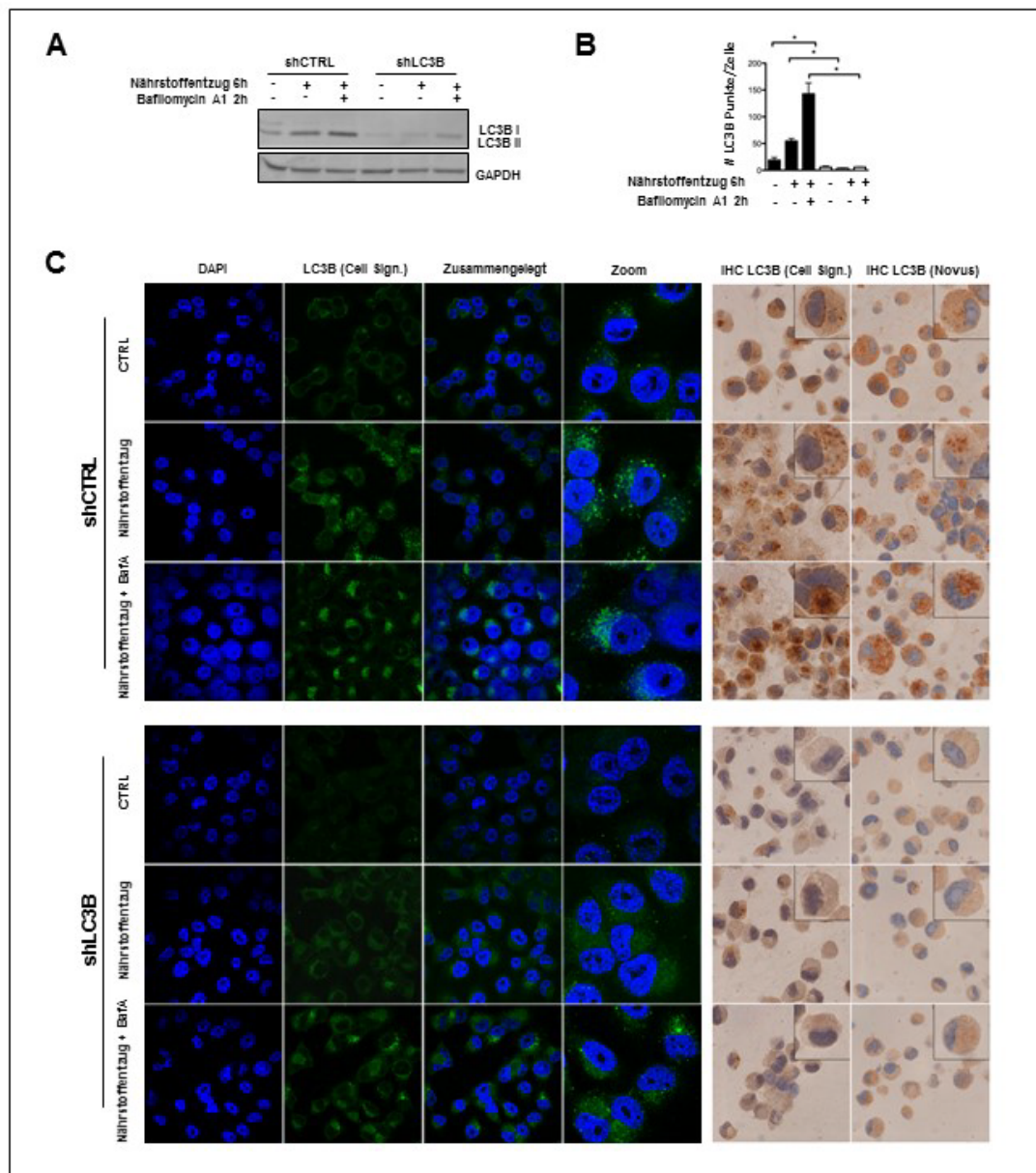


Abb. 2 Validierung der immunhistochemischen Färbung für LC3B. Autophagie wurde durch Nährstoffentzug in EBSS Medium induziert, und der Autophagie-Flux mittels Bafilomycin A1 inhibiert. Bafilomycin A1 inhibiert die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom. (A) LC3B Western Blot Analyse der H1299 LC3B-depletierten Zellen (shLC3B) und Kontrollen (shCTRL) nach Nährstoffentzug und Autophagie-Inhibition mittels Bafilomycin A1. Die GAPDH Proteinexpression diente der Ladekontrolle. Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ Software. (B) Quantifizierung der LC3B positive Punkte aus der Immunfluoreszenz-Untersuchung, die in C dargestellt ist. Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ Software. Der nicht-parametrische Man-Whitney-U Test wurde für die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Gruppen verwendet: * $p < 0.05$. (C) Immunfluoreszenz (linke Seite) und Immunhistochemie (rechte Seite) von LC3B in H1299 Kontrollzellen und LC3B-depletierten

Zellen, nach Nährstoffentzug und Autophagie-Inhibition mittels Bafilomycin A1. Die Immunfluoreszenz erfolgte mittels LC3B/Cell Signaling Antikörper und Kerngegenfärbung mittels DAPI. Die Immunhistochemie wurde mit zwei unterschiedlichen LC3B Antikörpern durchgeführt (Cell Signaling und Novus).

(Mit freundlicher Genehmigung adaptiert aus [25])

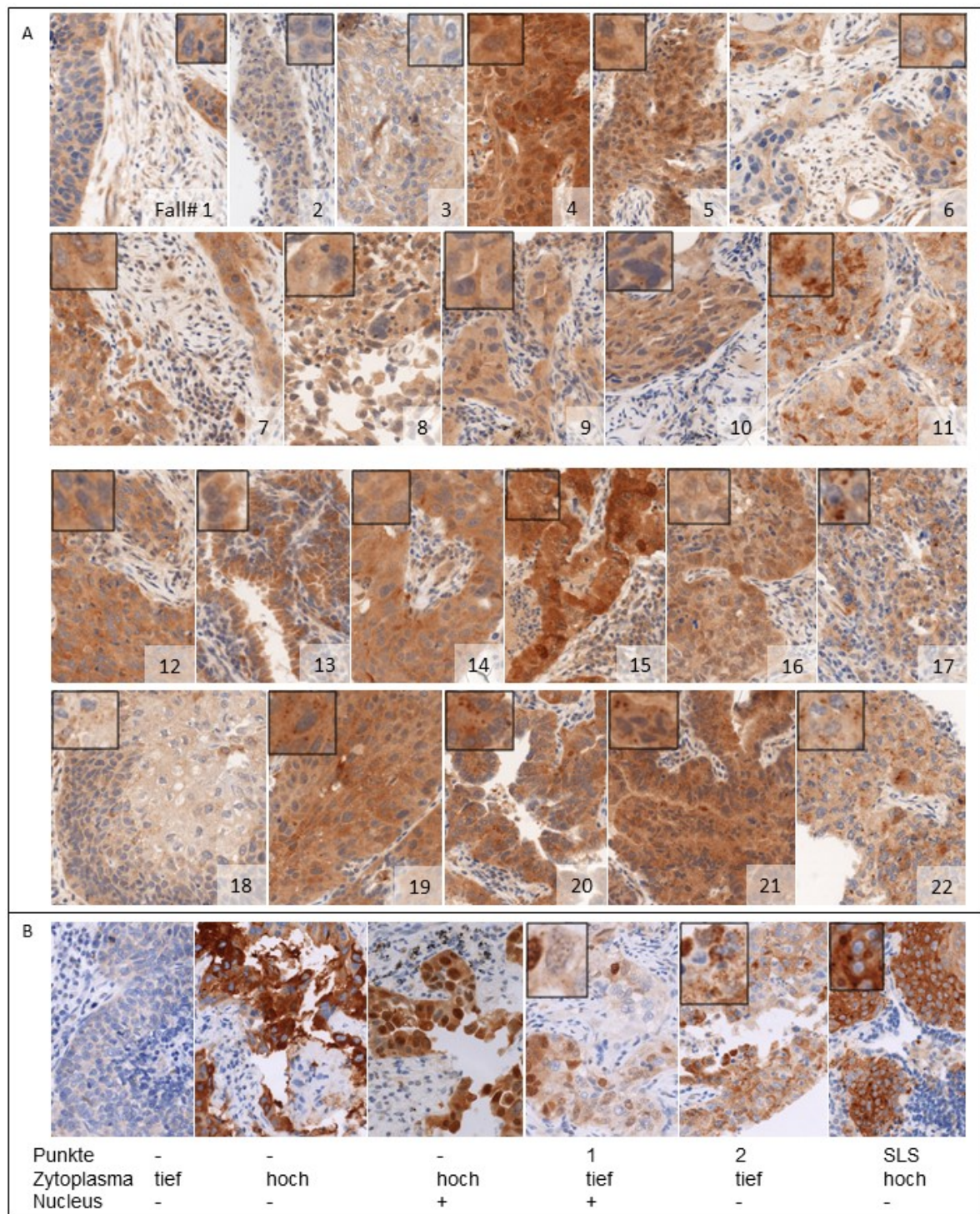


Abb. 3 Immunhistochemische Färbung für LC3 und p62. (A) LC3 Färbemuster der 22 Fälle, die auch mittels Western Blot validiert worden sind (nicht gezeigt). Fälle 1-5 und 12-16 sind zeigen keine punkt-förmige LC3-Expression. Fälle 6-11 und 17-22 zeigen ein deutliches punkt-förmiges LC3-Färbemuster, bei unterschiedlich starke ausgeprägter diffuser zytoplasmatischer LC3-Expression. (B) Beispiele der p62 Färbung mit zytoplasmatischem,

punkt-förmigem und grobem (SLS) Färbemuster. (Gesamtvergrößerung 400x; Insets: Gesamtvergrößerung 1000x)
(Adaptiert aus [24], keine Genehmigung notwendig.)

1. Adams O, Janser FA, Dislich B et al. (2018) A specific expression profile of LC3B and p62 is associated with nonresponse to neoadjuvant chemotherapy in esophageal adenocarcinomas. *PLoS One* 13:e0197610
2. Berezowska S, Galván JA (2017) Immunohistochemical detection of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in formalin fixed and paraffin embedded tissue. In: Pellicciari C, Biggiogera M (eds) *Histochemistry of Single Molecules*. Springer Nature, p 189-194.
3. Chen N, Karantza-Wadsworth V (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1793:1516-1523
4. Chude CI, Amaravadi RK (2017) Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci* 18
5. Daisuke I, Takashi S, Yoichiro M et al. (2012) Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Science* 103:760-766
6. Fan L, Yin S, Zhang E et al. (2018) Role of p62 in the regulation of cell death induction. *Apoptosis* 23:187-193
7. Jiang P, Mizushima N (2014) Autophagy and human diseases. *Cell research* 24:69-79
8. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M (2015) p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal* 282:4672-4678
9. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1-222
10. Ladoire S, Enot D, Senovilla L et al. (2016) The presence of LC3B puncta and HMGB1 expression in malignant cells correlate with the immune infiltrate in breast cancer. *Autophagy* 12:864-875
11. Langer R, Neppl C, Keller MD et al. (2018) Expression Analysis of Autophagy Related Markers LC3B, p62 and HMGB1 Indicate an Autophagy-Independent Negative Prognostic Impact of High p62 Expression in Pulmonary Squamous Cell Carcinomas. *Cancers* (in press)
12. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42
13. Liu JL, Chen FF, Lung J et al. (2014) Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*
14. Mancias JD, Kimmelman AC (2016) Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J Mol Biol* 428:1659-1680
15. Martinet W, Roth L, De Meyer GRY (2017) Standard Immunohistochemical Assays to Assess Autophagy in Mammalian Tissue. *Cells* 6
16. Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans J-P et al. (2013) Immunohistochemical analysis of macroautophagy: Recommendations and limitations. *Autophagy* 9:386-402
17. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007) Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 7
18. Mizushima N (2010) Autophagy. *FEBS Lett* 584:1279

19. Mizushima N (2018) A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology* 20:521-527
20. Moscat J, Diaz-Meco MT (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci* 37:230-236
21. Nezis IP, Stenmark H (2011) p62 at the Interface of Autophagy, Oxidative Stress Signaling, and Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* 17:786-793
22. Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R et al. (2018) Targeting autophagy in cancer. *Cancer*
23. Ruan H, Xu J, Wang L et al. (2018) The prognostic value of p62 in solid tumor patients: a meta-analysis. *Oncotarget* 9:4258-4266
24. Schlafli AM, Adams O, Galvan JA et al. (2016) Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7:39544-39555
25. Schlafli AM, Berezowska S, Adams O et al. (2015) Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* 59:2481
26. Wang X, Du Z, Li L et al. (2015) Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer: relation with malignant behaviors and clinical outcome. *Int J Clin Exp Pathol* 8:10644-10652
27. White E, Dipaola RS (2009) The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research* 15:5308-5316